

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/092359 A1

(51) 国際特許分類: C12N 5/08, A61L 27/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005071

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 8 日 (08.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-109707 2003 年 4 月 15 日 (15.04.2003) JP
特願2003-176351 2003 年 6 月 20 日 (20.06.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 矢永 博子 (YANAGA, Hiroko) [JP/JP]; 〒8020044 福岡県北九州市小倉北区熊本3丁目16-1 アンビエント小倉912 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 成瀬 勝夫, 外 (NARUSE, Katsuo et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋2丁目11番5号 TKK 西新橋ビル5階 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

BEST AVAILABLE COPY

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING CARTILAGE CELLS FOR TRANSPLANTATION

(54) 発明の名称: 移植用軟骨細胞の製法

(57) Abstract: It is intended to provide a process by which a large amount of normal human cartilage cells or cell masses can be quickly obtained without any fear of viral or bacterial infection. Namely, a process for producing human cartilage cells characterized by comprising culturing cartilage cells obtained from a cartilage having perichondrium such as an auricular cartilage together with the perichondrium; and a process for producing human cartilage cells characterized by comprising sowing cells to be cultured once or more to give a single-layered or double-layered structure and then culturing the cells to give cartilage cell masses.

(57) 要約: 本発明は、ヒトの軟骨細胞を、細菌・ウイルスによる感染の恐れがなく、しかも、迅速かつ大量に正常な軟骨細胞またはその細胞塊を得る方法を提供することを目的とし、軟骨膜を有する軟骨から得られる軟骨細胞、例えば耳介軟骨を軟骨膜と共に培養することを特徴とするヒト軟骨細胞の製法であり、また、培養細胞を単層または重層的に1回または2回以上播種して培養し、軟骨細胞塊を得ることを特徴とするヒト軟骨細胞の製法である。

WO 2004/092359 A1

DESCRIPTION

METHOD OF PRODUCING CHONDROCYTES FOR TRANSPLANTATION

Technical Field

This invention relates to a method of producing normal human chondrocytes and the normal human chondrocytes obtained by the method. It also relates to a cartilage therapy material using the thus obtained normal human chondrocytes.

Background Art

In a cartilage tissue, chondrocytes exist in the state of being embedded in the matrix. These chondrocytes can be separated from the matrix by treating the cartilage with an enzyme such as collagenase. Attempts have been made to utilize these separated chondrocytes in transplantation therapy, in particular, autotransplantation of chondrocytes for treating cartilage-related diseases. It has been experimentally confirmed that transplantation therapy with the use of this method is applicable to animals such as rabbits and cows from which a large amount of cells can be obtained (see, for example, Bentry, et al., Nature 230: 385-388(1971), Green, Clin. Orthop. 124:237-250(1977); Wakitani et al., J. Bone and Joint Surgery 71B: 74-80(1989); Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 96:1390-1398(1995); and Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 97:168-178(1996)).

Attempts have been also made to culture human chondrocytes in, for example, articular cartilage, auricular cartilage and costal cartilage (Aulthouse et al., *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 25: 659-668(1989); Brittberg et al., *The New England Journal of Medicine* 331: 889-895(1994); Ting et al., *Annals of Plastic Surgery* 40: 413-421(1998); and Rodriguez et al., *Plastic and Reconstructive Surgery* 103:1111-1119(1999)).

In humans, however, only a small amount of cartilage can be collected, therefore, only a small number of chondrocytes can be used at the initiation of the culture. Moreover, human chondrocytes can be minimally proliferated by the conventional methods and proliferated chondrocytes, if any are obtained, convert into fibroblasts having different characters. Thus, it is highly difficult to apply human chondrocytes to transplantation therapy in practice. Namely, there is a problem that although a large amount of normal chondrocytes is required for transplantation in humans, it has been impossible to obtain a sufficient amount of human chondrocytes using the currently available methods.

To overcome this problem, the present inventor proposed to quickly culture a large amount of human chondrocytes by co-culturing human chondrocytes together with perichondral cells in the chondrogenic stage serving as feeder cells supporting the proliferation ability of the chondrocytes (WO

02/12451 (2002)). The use of nonhuman animal feeder cells is, however, accompanied with problems of unexpected bacterial or viral infections and complicated treatments are needed to prevent these infections.

Referential Documents

1. Bentry, et al., Nature 230: 385-388(1971)
2. Green, Clin. Orthop. 124:237-250(1977)
3. Wakitani et al., J. Bone and Joint Surgery 71B: 74-80 (1989)
4. Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 96:1390-1398(1995)
5. Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 97:168-178(1996)
6. Aulthouse et al., In Vitro Cellular & Developmental Biology 25: 659-668(1989)
7. Brrittberg et al., The New England Journal of Medicine 331: 889-895(1994)
8. Ting et al., Annals of Plastic Surgery 40: 413-421(1998)
9. Rodriguez et al., Plastic and Reconstructive Surgery 103:1111-1119(1999)
10. WO 02/12451 (2002)

Disclosure of the Invention

An object of the present invention is to provide a method to quickly obtain a large amount of normal human chondrocytes

or a mass thereof without fear of bacterial or viral infection. Another object of the present invention is to provide a cartilage therapy material with the use of the normal human chondrocytes or a mass thereof thus obtained. Accordingly, the present invention is as follows:

(1) A method of producing human chondrocytes characterized by comprising co-culturing chondrocytes obtained from a cartilage having perichondrium together with the perichondrium.

(2) The production method as described in the above (1) characterized in that the cartilage is auricular cartilage.

(3) The production method as described in the above (1) characterized by comprising monolayer or multilayer seeding of the cultured cells once or more and culturing to give a chondrocyte mass.

(4) The production method as described in the above (2) characterized by comprising monolayer or multilayer seeding the cultured cells once or more and culturing to give a chondrocyte mass.

(5) A cartilage therapy material comprising human chondrocytes obtained by a method as described in any of the above (1) to (4) either alone or together with an embedding material.

(6) The cartilage therapy material as described in the above (5) wherein the embedding material is one or more members

selected from among collagen, polyglycolic acid, polylactic acid, alginic acid, polyethylene oxide, fibrin adhesive, polylactic acid-polyglycolic acid copolymer, proteoglycan, glucosaminoglycan and human dermis.

Brief Description of Drawings

Fig. 1 presents a photograph showing a sheet-like gel mass obtained after multilayer culturing chondrocytes have been subcultured for 2 weeks.

Fig. 2 presents a photograph showing the result of hematoxylin-eosine staining of the gel-like chondrocyte mass shown in Fig. 1.

Fig. 3 presents a photograph showing the result of immunological staining for type II collagen serving as a cartilage tissue molecular marker.

Fig. 4 presents a photograph showing the result of hematoxylin-eosine (HE) staining of a specimen sampled from a transplantation site.

Fig. 5 presents a photograph showing the result of immunological staining of a specimen sampled from a transplantation site for type II collagen serving as a cartilage tissue molecular marker.

Fig. 6 presents a photograph showing the result of toluidine blue staining of a specimen sampled from a transplantation site.

Best Mode for Carrying Out the Invention

By further improving the preliminarily proposed method with the use of feeder cells (WO 02/12451 (2002)), the present inventor has established a more convenient method of culturing and proliferating chondrocytes such as auricular cartilage cells without resorting to feeder cells. Although it has been considered that feeder cells are required in culturing and proliferating chondrocytes, the present inventor has found out that chondrocytes can be cultured and proliferated without resorting to feeder cells. That is to say, the method according to the present invention can be conveniently carried out while omitting the troublesome procedures needed in the case of using feeder cells and, moreover, the risk of infection from the feeder cells and so on can be avoided thereby. Thus, it can be said that this method is highly safe and most suitable for autotransplantation in humans.

It has been further found out that a cartilage mass, which is obtained by multilayer culturing human chondrocytes that have been proliferated by the above-described method, is usable in transplantation therapy without resorting to a support.

In the case where the human cartilage to be used in the present invention is auricular cartilage, it is favorable from a cosmetic viewpoint to make a slight incision in the post auricular matrix skin and collect a cartilage tissue of a small

size (about 1x1 cm²). It is favorable that the thus collected cartilage tissue has perichondrium bonded to one face. Owing to this procedure, the cartilage can be quickly regenerated from the perichondrium remaining on the other face at the cartilage collection site and, as a result, the overall healing can be rapidly completed.

To obtain cells required for transplantation, the auricular cartilage having the perichondrium thus collected is finely diced and subjected to monolayer culture. In this step, it is preferable to employ a culture medium containing a cytokine required in the proliferation of the chondrocytes. Transplantation can be performed merely by using the cells obtained by this monolayer culture. By further subjecting the cells thus proliferated by the monolayer culture to multilayer culture several times, it is possible to obtain a tissue that has a high mechanical strength and therefore is durable when handled with instruments such as tweezers and never undergoes dispersion or absorption *in vivo* after transplantation. Although the number of multilayer seeding varies depending on the size of a desired tissue, it is generally preferable to carry out the multilayer seeding three or four times.

The thus obtained tissue is fed into an injection syringe or the like and, after attaching a needle, is then injected into a defect in a cartilage to thereby treat or repair nasal deformation, nose elevation, facial bone deformation, facial

bone defect, gnathoplasty, skull deformation, skull defect, arthrosis deformans, microtia or other diseases accompanied by a defect in a cartilage or a defective cartilage. In this step, the cartilage tissue may be used in the form of a mixture with a carrier selected from among collagen, polyglycolic acid (PGA), polylactic acid, alginate, polyethylene oxide, fibrin adhesive, polylactic acid-polyglycolic acid copolymer, proteoglycan or glucosaminoglycan. The chondrocytes obtained by the production method according to the present invention are practically usable as such without resorting to a carrier.

A. Human chondrocytes

The method of producing chondrocytes according to the present invention can be applied to the culture of chondrocytes of any human cartilage tissue having perichondrium bonded thereto such as auricular cartilage, costal cartilage, articular cartilage, intervertebral cartilage or tracheal cartilage. In particular, it is suitable for culturing and proliferating chondrocytes of auricular cartilage.

The chondrocytes to be used in the production method according to the present invention can be obtained from a human cartilage tissue having perichondrium by publicly known methods. It is generally preferable that an excised cartilage tissue is diced with a surgical knife or the like, treated with collagenase and then cultured and proliferated. For example,

the process can be performed as follows.

1) A cartilage tissue is excised and disinfected by allowing to stand at about 4°C overnight together with an antibiotic (for example, penicillin or kanamycin) or an antifungal agent (for example, amphotericin B). Then, the cartilage tissue is diced with a scalpel, etc.

2) The diced cartilage tissue is then transferred into a medium containing type II collagenase and allowed to stand at about 4°C overnight. Next, it is shaken at 37°C for 4 hours.

3) The thus treated tissue is centrifuged and the obtained precipitate is employed in the culture.

By this method, 3 to 5×10^6 chondrocytes can be obtained at the first generation of subculture from a human auricular cartilage tissue piece (1 cm²). In the culture method according to the present invention, known growth factors can be used, especially ones capable of stimulating the proliferation of cartilage. Appropriately selected forms among FGF (for example, bFGF), IGF (for example, IGF-I), bone morphogenetic protein 9 (BMP-9) or combinations thereof.

B. Method of culturing human chondrocytes

To culture human chondrocytes, use can be made of publicly known media suitable for culturing chondrocytes. In addition to fetal bovine serum (FBS) or human serum and hydrocortisone, the media may optionally contain a proliferation factor such

as human bFGF or human IGF-I (Cuevas et. al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 611-618 (1988); and Froger-Gaillard et al., Endocrinol. 124, 2365-72). As an example of such a medium, DME(H) medium containing FBS (preferably about 10%), human bFGF (preferably about 10 ng/ml), hydrocortisone (preferably 40 ng/ml) and human IGF-I (preferably 5 ng/ml) can be cited. It is also possible to use autoserum obtained from a patient himself/herself so as to enhance the safety.

Next, the culture method according to the present invention will be described in greater detail.

1) Primary Culture

The chondrocytes are seeded in a medium contained in a flask and cultured in a CO₂ incubator under such conditions as being suitable for the culture of chondrocytes (for example, at 37°C and 10% CO₂). The culture is continued until the proliferated cells form a confluent monolayer (usually for 10 to 14 days).

2) Subculture

The subculture can be carried out with the use of the same culture medium as the primary culture (usually 7 days per subculture). In the case of subculturing auricular cartilage-origin cells obtained by the primary culture, the cell count increases about 1000 times from P0 (primary culture) to P4. When a larger number of chondrocytes are needed, the subculture can be further repeated.

3) Multilayer Culture

A gel-like chondrocyte mass can be obtained by multilayer seeding and culturing the subcultured human chondrocytes once or more, preferably 3 to 4 times. In the chondrocyte mass thus obtained, the human chondrocytes are surrounded by a cartilage matrix containing aggrecan, etc. and the cells are bonded to each other via the matrix such as aggrecan to form a gel-like cell mass.

C. Cartilage Therapy Material

The above described sub cultured or multilayer cultured human chondrocytes or the cell mass obtained by the present invention, either as such or in the state of being embedded in a biomaterial, can be used in transplantation as a cartilage therapy material. Examples of the carrier in which the human chondrocytes or the cell mass can be embedded include collagen, polyglycolic acid (PGA), polylactic acid, alginate, polyethylene oxide, fibrin adhesive, polylactic acid-polyglycolic acid copolymer, proteoglycan, glycosaminoglycan and mixtures thereof.

By appropriately selecting and combining the carriers in which the chondrocytes are embedded, the cartilage therapy material can induce not only chondrogenesis but also cartilaginous ossification. As an example of the carrier enabling the induction of the cartilaginous ossification, human

dermis may be cited. Moreover, it is possible to further promote the ossification by using a growth factor capable of promoting osteogenesis such as a bone morphogenetic protein (BMP).

To further illustrate the present invention in greater detail, and not by way of restriction, the following examples will be given.

Example 1: Chondrocyte culture

Composition of culture medium: To the DME(H) medium, 10% of FBS, 10 ng/ml of human FGF (Kaken Pharmaceutical Research Institute), 40 ng/ml hydrocortisone (Sigma) and 5 ng/ml human IGF-I (GIBCO) were added.

Collected cartilage: From human rear auricular cartilage, a sample piece (about 1x1 cm²) having perichondrium bonded to one face was collected.

(a) Chondrocyte fraction

The cartilage piece obtained above was disinfected with penicillin G (800 u/ml), kanamycin (1 mg/ml) and Fungizone (2.5 ug/ml). It was then diced with a scalpel and then allowed to stand in F-12 medium containing 0.3% of type II collagenase (Worthington Biochemical) at 4°C overnight. On the next day, the culture medium was shaken at 37°C for 4 hours and centrifuged. The precipitate thus obtained was employed as a cell fraction at the initiation of the culture.

(b) Primary Culture

The cell fraction as described above was seeded by using the above-described medium in a flask having a base area of 75 cm². The cell fraction in this flask was cultured in a CO₂ incubator at a CO₂ concentration adjusted to 10%. The culture medium was replaced twice a week. As a result, the chondrocytes formed a confluent monolayer within a culture time of 10 to 14 days. The obtained cells were used for the following subculture.

It was confirmed that similar results were obtained by using, as the substitute for FBS, autoserum obtained by centrifuging the autoserum of a patient at 3000 rpm for 10 minutes.

(c) Subculture

Subculture was carried out by seeding 1×10^6 of the primary-cultured cells in a flask having a base area of 175 cm² and employing the same conditions as the primary culture. After culturing for 7 days, the cells formed a confluent monolayer. The obtained cells were employed in the next subculture. As a result, the cell count on the fourth subculture increased about 1000 times, compared with the cell count at the initiation of the subculture.

(d) Multilayer Culturing

The chondrocytes obtained by the subculture were seeded by overlaying thrice at a density of 1×10^6 cells/cm² and cultured

by multilayer culturing. After culturing for 2 weeks, a sheet-like gel mass was formed (FIG. 1). When the gel-like chondrocyte mass was stained with hematoxylin-eosine (HE), it was observed that the cells were multilayered and bonded together via the matrix (FIG. 2). When the cells were immunologically stained for type II collagen serving as a molecular marker of cartilage tissue, the extracellular matrix was stained, thus indicating that the extracellular matrix was a cartilage-specific matrix (FIG. 3).

Example 2: Transplantation of chondrocytes

First, the medium was removed from the culture flask and the cells were harvested with a cell lifter. Then the harvested cells were collected with a syringe. Next, the chondrocytes collected into the syringe were injected into a defect in a cartilage of a nude mouse by using an injection needle. Six months after the transplantation, a specimen was sampled from the transplantation site and histologically examined to confirm the success in engraftment. When the sampled tissue was stained with hematoxylin-eosine (HE), namely, it was observed that cells were multilayered and bonded to each other via the matrix (FIG. 4). When the cells were immunologically stained for type II collagen serving as a molecular marker of cartilage tissue, the extracellular matrix was stained, indicating that the extracellular matrix was a cartilage-specific matrix (FIG. 5).

Moreover, metachromacia was shown in toluidine blue staining, indicating the presence of aggrecan serving as a cartilage marker (FIG. 6). These results indicated that the transplanted chondrocytes had formed a cartilage tissue.

Industrial Applicability

According to the present invention, a large amount of normal human chondrocytes or a mass thereof can be quickly obtained in a large amount without fear of bacterial or viral infection.

Claims

1. A method of producing human chondrocytes characterized by comprising co-culturing chondrocytes obtained from a cartilage having perichondrium together with the perichondrium.

2. The production method as claimed in claim 1 characterized in that the cartilage is auricular cartilage.

3. The production method as claimed in claim 1 characterized by comprising monolayer or multilayer seeding the cultured cells once or more and culturing to give a chondrocyte mass.

4. The production method as claimed in claim 2 characterized by comprising monolayer or multilayer seeding the cultured cells once or more and culturing to give a chondrocyte mass.

5. A cartilage therapy material comprising human chondrocytes obtained by a method as claimed in any of claims 1 to 4 either alone or together with an embedding material.

6. The cartilage therapy material as claimed in claim 5 wherein the embedding material is one or more members selected from among collagen, polyglycolic acid, polylactic acid, alginic

acid, polyethylene oxide, fibrin adhesive, polylactic

acid-polyglycolic acid copolymer, proteoglycan,

glucosaminoglycan or human dermis.

ABSTRACT

This invention is intended to provide a method to quickly obtain a large amount of normal human chondrocytes or a mass thereof without fear of bacterial or viral infection. Namely, a method of producing human chondrocytes characterized by comprising co-culturing chondrocytes obtained from a cartilage having perichondrium, for example, auricular cartilage together with the perichondrium; and a method of producing human chondrocytes characterized by comprising monolayer or multilayer seeding the cultured cells once or more and culturing to give a chondrocyte mass.

Fig.1



Fig.2



Fig.3



Fig.4

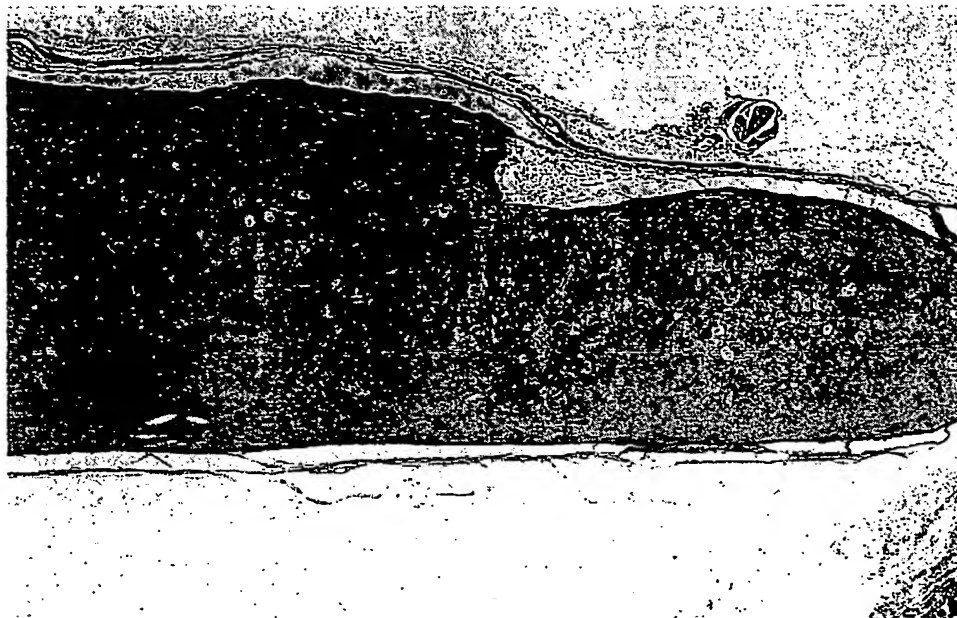


Fig.5



Fig.6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N5/08, A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N5/08, A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/012451 A1 (Hiroko YANAGA), 14 February, 2002 (14.02.02), & AU 200178700 A & EP 1331264 A1 & US 2003/0180943 A1	1-6
X	Nobuo ADACHI et al., "Soshiki Kogaku ni Motozuku Baiyo Nankotsu Saibo Ishoku", Igaku no Ayumi, 2002, Vol.200, No.3, pages 258 to 259	1-6
X	Brittberg M. et al., Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, N.Engl.J.Med., 1994, Vol.331, No.14, pages 889 to 895	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 May, 2004 (06.05.04)

Date of mailing of the international search report
25 May, 2004 (25.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005071

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kazuya MATSUDA et al., "Jinko Nankotsu Sakusei no Kokoromi", Igaku no Ayumi, 1995, Vol.172, No.6, pages 390 to 391	1-6

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/092359 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 5/08, A61L 27/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005071

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 8 日 (08.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-109707 2003 年 4 月 15 日 (15.04.2003) JP
特願2003-176351 2003 年 6 月 20 日 (20.06.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 矢永 博子 (YANAGA, Hiroko) [JP/JP]; 〒8020044 福岡県北九州市小倉北区熊本3丁目16-1 アンビエント小倉912 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 成瀬 勝夫, 外 (NARUSE, Katsuo et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋2丁目11番5号 T K K 西新橋ビル5階 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/092359 A1

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING CARTILAGE CELLS FOR TRANSPLANTATION

(54) 発明の名称: 移植用軟骨細胞の製法

(57) Abstract: It is intended to provide a process by which a large amount of normal human cartilage cells or cell masses can be quickly obtained without any fear of viral or bacterial infection. Namely, a process for producing human cartilage cells characterized by comprising culturing cartilage cells obtained from a cartilage having perichondrium such as an auricular cartilage together with the perichondrium; and a process for producing human cartilage cells characterized by comprising sowing cells to be cultured once or more to give a single-layered or double-layered structure and then culturing the cells to give cartilage cell masses.

(57) 要約: 本発明は、ヒトの軟骨細胞を、細菌・ウイルスによる感染の恐れがなく、しかも、迅速かつ大量に正常な軟骨細胞またはその細胞塊を得る方法を提供することを目的とし、軟骨膜を有する軟骨から得られる軟骨細胞、例えば耳介軟骨を軟骨膜と共に培養することを特徴とするヒト軟骨細胞の製法であり、また、培養細胞を単層のまたは重層的に 1 回または 2 回以上播種して培養し、軟骨細胞塊を得ることを特徴とするヒト軟骨細胞の製法である。

明細書

移植用軟骨細胞の製法

技術分野

本発明は、正常ヒト軟骨細胞の製法およびかかる製法により得られる正常ヒト軟骨細胞に関する。また、本発明は、かくして得られた正常ヒト軟骨細胞を用いた軟骨治療材に関する。

背景技術

軟骨細胞は組織中では基質の中に細胞が包埋された状態で存在しており、酵素、例えばコラゲナーゼで軟骨を処理して、基質成分から軟骨細胞を単離することができる。この単離した軟骨細胞を利用して、軟骨に関わる疾患の治療に対し、移植治療、特に軟骨細胞の自家移植が考えられてきた。ヒト以外の動物、例えばウサギ、ウシ等の如く多量の細胞が得られる場合については、この方法による移植治療が可能であることが実験的に確認されている(例えば、Bentry, et al., Nature 230: 385-388 (1971), Green, Clin. Orthop. 124:237-250 (1977), Wakitani et al., J. Bone and Joint Surgery 71B: 74-80 (1989), Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 96:1390-1398 (1995), Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery 97:168-178 (1996))。

これまで、ヒトにおいても関節軟骨、耳介軟骨および肋軟骨等の軟骨細胞の培養が試みられてきた(Aulthouse et al., In Vitro Cellular & Developmental Biology 25: 659-668 (1989), Brinberg et al., The New England Journal of Medicine 331:

889-895(1994), Ting et al., Annals of Plastic Surgery 40: 413-421(1998), Rodriguez et al., Plastic and Reconstructive Surgery 103:1111-1119(1999))。

しかしながら、ヒトではわずかの量の軟骨しか採取できないため、培養開始時に僅かな数の軟骨細胞しか用いることができない上に、ヒト軟骨細胞は従来の培養法では増殖が著しく少なく、更に増殖すると軟骨細胞から繊維芽細胞に形質を変えてしまうために移植治療の実用に供することは極めて困難であった。即ち、ヒトにおいては、移植のために大量の正常な軟骨細胞が必要であるにもかかわらず、十分な量の軟骨細胞を得ることができないという問題があった。

この問題を解決するために、本発明者はヒト軟骨細胞を軟骨細胞増殖能を支持するフィーダー細胞として軟骨形成期の軟骨周辺細胞と共培養することにより迅速且つ大量にヒト軟骨細胞を培養することを提案した(WO 02/12451(2002))。しかし、ヒト以外の動物のフィーダー細胞を使用することは、細菌や不測のウイルスによる感染の問題があり、それを防ぐために煩雑な処理が必要であった。

関連文献

1. Bentry, et al., Nature 230: 385-388(1971)
2. Green, Clin. Orthop. 124:237-250(1977)
3. Wakitani et al., J. Bone and Joint Surgery 71B: 74-80 (1989)
4. Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery

- 96:1390-1398 (1995)
- 5 . Paige et al., Plastic and Reconstructive Surgery
97:168-178 (1996)
- 6 . Aulthouse et al., In Vitro Cellular & Developmental
Biology 25: 659-668 (1989)
- 7 . Brrittberg et al., The New England Journal of Medicine
331: 889-895 (1994)
- 8 . Ting et al., Annals of Plastic Surgery 40: 413-421 (1998)
- 9 . Rodriguez et al., Plastic and Reconstructive Surgery
103:1111-1119 (1999)
10. WO 02/12451 (2002)

発明の開示

本発明は、ヒトの軟骨細胞を、細菌・ウイルスによる感染の恐れがなく、しかも、迅速かつ大量に正常な軟骨細胞またはその細胞塊を得る方法を提供することを目的とする。また、本発明は、かくして得られた正常ヒト軟骨細胞またはその細胞塊を用いた軟骨治療材を提供することを目的とする。即ち、本発明は次の通りである。

(1) 軟骨膜を有する軟骨から得られる軟骨細胞を軟骨膜と共に培養することを特徴とするヒト軟骨細胞の製法。

(2) 該軟骨が、耳介軟骨であることを特徴とする(1)に記載の製法。

(3) 培養細胞を単層的または重層的に1回または2回以上播種して培養し、軟骨細胞塊を得ることを特徴とする(1)の製法。

(4) 培養細胞を単層的または重層的に1回または2回以上播種して培養し、軟骨細胞塊を得ることを特徴とする(2)記載の製法。

(5) 前項(1)乃至(4)に記載の製法により得られるヒト軟骨細胞単独または該軟骨細胞と包埋材料とからなる軟骨治療材。

(6) 該包埋材料が、コラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、アルギン酸、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸・ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン、グルコサミノグリカンまたはヒトの真皮の一種又は二種以上から選ばれる請求項5に記載の軟骨治療材。

図面の簡単な説明

図1は、継代培養において得られた軟骨細胞を2週間の重層培養後に得られた、シート状のゲル塊を示す写真である。

図2は、図1のゲル状の軟骨細胞塊についてヘマトキシリンーエオジンで染色した結果を示す写真である。

図3は、軟骨組織の分子マーカーであるII型コラーゲンについて免疫染色を行った結果を示す写真である。

図4は、移植部位から一部採取して、ヘマトキシリンーエオジン(H.E)染色した結果を示す写真である。

図5は、移植部位から一部採取して、軟骨組織の分子マーカーであるII型コラーゲンについて免疫染色を行った結果を示す写真である。

図6は、移植部位から一部採取して、トルイジン・ブルー染色を行った結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

本発明者は、先に提案したフィーダー細胞を用いる方法（W002/12451(2002)）を更に改良し、耳介軟骨等の軟骨細胞を、フィーダー細胞を用いることなく、より簡便に培養し増殖させる方法を見出した。従来は、軟骨細胞の培養・増殖にはフィーダー細胞が必要であると考えられていたが、本発明者は、フィーダー細胞を用いずとも、軟骨細胞の培養・増殖が可能であることを見出した。かくして、本発明の方法は、フィーダー細胞を用いる場合の煩雑な操作を回避でき簡便化できるとともに、フィーダー細胞からの感染等の危険も回避でき、ヒトへの自家移植に最適で安全なものと言える。

また、かかる方法で増殖させたヒト軟骨細胞を更に重層培養して軟骨塊とし、これを支持物質無しで移植治療に用いることが可能であることも見出した。

本発明で用いるヒト軟骨が耳介軟骨である場合は、美容的配慮から耳介後部基部より僅かな皮膚切開で少量（1×1平方センチ程度）の軟骨組織を採取することが好ましい。この時の採取軟骨組織は片面に軟骨膜が付着していることが好ましい。この操作により、軟骨採取部位は残されたもう片面の軟骨膜より軟骨が素早く再生され治癒全体も早く行われる結果となる。

次に必要な移植用細胞を得るため、採取された軟骨膜付き耳介軟骨を細かく切断し(dice)、単層培養を開始する。この時に使用する培地には軟骨細胞の増殖に必要なサイトカインを添加することが好ましい。この単層培養だけでも移植可能であるが、更に、

この単層培養で増殖した細胞を用いて数回に渡り重層培養を行うことにより、ピンセット等の器具で取り扱える程度の物理的強度を有し、且つ生体に移植した時に分散・吸収されない組織を得ることができる。重層の播種回数は、所望する組織の大きさによって異なるが、一般的には3～4回が好ましい。

この組織は、注射筒等に入れ、注射針を付けてから軟骨欠損部位に注入して鼻の変形、隆鼻、顔面骨変形、顔面骨欠損、頤形成、頭蓋骨変形、頭蓋部欠損、変形性関節症、小耳症、その他軟骨欠損を伴う疾患や軟骨欠損部の治療・修復に供することができる。この時に、この軟骨組織にキャリアーとしてコラーゲン、ポリグリコール酸 (PGA ; polyglycolic acid)、ポリ乳酸 (polylactic acid)、アルギン酸塩 (Alginate)、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸－ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン (proteoglycans)、グリコサミノグリカン (glucosaminoglycan) を混合して用いても良い。なお、本発明の製法により得られる軟骨細胞はキャリアー無しでも実用に供することができる。

A. ヒト軟骨細胞

本発明の軟骨細胞の製法は、軟骨膜が付着した状態のヒト軟骨組織、例えば耳介軟骨、肋軟骨、関節軟骨、椎間軟骨および気管軟骨の軟骨細胞の培養に用いることができるが、特に耳介軟骨の軟骨細胞の培養・増殖に適している。

本発明の製法に供される軟骨細胞は、公知の方法により軟骨膜を付着させたヒト軟骨組織から得ることができる。一般的には摘

出した軟骨組織をメス等を用いて細切してコラゲナーゼで処理し、培養・増殖させることが好ましい。そのプロセスを具体的に例示すれば次のようである。

1) 摘出した軟骨組織を抗生物質（例えばペニシリン、カナマイシン）や抗真菌剤（例えばアムホテリシンB）にて一晚約4℃で静置して除菌し、次にメス等を用いて軟骨組織を細切する。

2) 細切した軟骨組織をII型コラゲナーゼを含む培地に移し、一晚約4℃で静置する。さらに、37℃にして4時間振とうする。

3) 次に、処理した組織を遠心して、この沈澱物を培養に供する。

この方法により、1平方センチのヒト耳介軟骨組織から継代1代目で $3 \sim 5 \times 10^6$ 細胞個の軟骨細胞を得ることができる。また、本発明の培養方法において、公知の増殖因子、特に軟骨の増殖を刺激するもの、例えばFGF（例えばbFGF）、IGF（例えばIGF-1）および骨形成因子9（BMP9）から適宜選択し、或いは組合わせて使用することができる。

B. ヒト軟骨細胞培養方法

ヒト軟骨細胞の培養は、軟骨細胞の培養に適した公知の培地を用いることができる。また、培地にはウシ胎仔血清（FBS）又はヒト血清、ヒドロコルチゾン（Hydrocortisone）の他に、ヒトbFGF、ヒトIGF-1等の増殖因子を適宜添加する（Cuevasら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 611-18, 1988；Froger-Gaillard等、Endocrinol. 124, 2365-72）。そのような培地の例として、DME（H）培地に、FBS（好ましくは10%程度）、ヒトbFGF（好ましくは

10ng/ml 程度)、ヒドロコルチゾン (好ましくは 40ng/ml)、ヒト IGF-1 (好ましくは 5ng/ml) を添加した培地を挙げることができる。なお、患者由来自家血清を用いることもでき、かくすることにより、より安全を図ることができる。

本発明の培養方法を具体的に例示すれば次のようである。

1) 初代培養

培地を入れたフラスコに軟骨細胞を播種し、軟骨細胞の培養に適した条件 (例えば 37℃、10%CO₂ 条件下) にて炭酸ガス培養器中で培養する。培養は、増殖した細胞が単層で密集的 (confluent) になるまで行う (通常 10～14 日間)。

2) 継代培養

継代培養は初代培養と同じ培地で行うことができる (通常、1 継代 7 日間)。初代培養で得られた細胞を継代した場合、耳介軟骨では P0 (初代培養) → P4 において細胞数が 1000 倍程度増加する。さらに多数の軟骨細胞を所望する場合には継代回数を適宜増加させることができる。

3) 重層培養

継代培養により得られたヒト軟骨細胞を重層的に 1 回または 2 回以上、好ましくは 3～4 回播種して培養することによって、ゲル状の軟骨細胞塊を得ることができる。得られた軟骨細胞塊中において、ヒト軟骨細胞はアグリカン等を含む軟骨基質で囲まれており、軟骨細胞同士がアグリカン等の基質を介して結合してゲル状の細胞塊を形成する。

C. 軟骨治療材

本発明により得られた前記の継代培養または重層培養したヒト軟骨細胞または細胞塊をそのまま又は生体材料に包埋し、これを軟骨治療材として移植に供することができる。ヒト軟骨細胞または細胞塊を包埋するキャリアーの例としてコラーゲン、ポリグリコール酸 (PGA ; polyglycolic acid)、ポリ乳酸 (polylactic acid)、アルギン酸塩 (Alginate)、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン (proteoglycans)、グリコサミノグリカン (glucosaminoglycan) が混合して用いても良い。

また、当該軟骨治療材は、軟骨細胞を包埋するキャリアーを適宜選択し、組合わせることにより、軟骨ばかりか内軟骨性骨化を誘導することができる。そのような内軟骨性骨化を誘導し得るキャリアーとしては例えばヒト真皮が挙げられるが、さらに骨形成を促進する成長因子、例えば骨形成因子 (BMP) を用いて骨化を促進させることができる。

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。ただし、以下の実施例は例示であり、本発明がこれらの実施例に制限されることはない。

実施例 1 軟骨細胞培養

培地組成 : DME (H) 培地に 10% FBS、10ng/ml ヒト FGF (科研製薬)、および 40ng/ml Hydrocortisone (Sigma)、および 5ng/ml ヒト IGF-1 (GIBCO) を添加した。

採取軟骨 : ヒト耳介後部基部軟骨から約 1 × 1 平方センチの片面に軟骨膜の付着した軟骨を採取した。

(a) 軟骨細胞画分

上記に得た、軟骨片をペニシリン G (800u/ml) およびカナマイシン (1mg/ml) およびファンギーソン (2.5ug/ml) で除菌し、次にメスで細切した後、03% コラゲナーゼ typeII (Worthington Biochemical) を含む F-12 培地中で 4℃ で一晩静置した。翌日 37℃ で 4 時間振とうした後、遠心し、その沈殿物を培養開始の細胞画分とした。

(b) 初代培養

上記細胞画分を上記培地を用いて底面積 7.5 cm² のフラスコに播種した。このフラスコを CO₂ Incubator 中で CO₂ 濃度を 10% に設定して培養した。培地は週 2 回交換した。その結果、軟骨細胞は、10～14 日間の培養により単層で集蜜的になった。得られた細胞を次の継代培養に使用した。

なお、FBS に代えて、患者の自家血を 3000rpm で 10 分間遠心分離して得られる自家血清を用いても同様の結果が得られることが確認された。

(c) 継代培養

継代培養は初代培養の細胞 1×10^6 個を底面積 17.5 cm² フラスコに播種して、初代培養と同じ条件で行った。7 日間の培養により単層で集蜜的になり、得られた細胞を次の継代培養に使用した。その結果、4 継代で細胞数が初代の 1000 倍程度増加した。

(d) 重層培養

継代培養において得られた軟骨細胞を 1×10^6 個/cm² の密度で 3 回播種し重層させ重層培養を実施した。2 週間の培養後、シ

ート状のゲル塊が形成された（図 1）。このゲル状の軟骨細胞塊についてヘマトキシリンーエオジン（H. E）染色したところ、細胞が重層化して細胞同士が基質を介して結合していることが示された（図 2）。また、軟骨組織の分子マーカーである II 型コラーゲンについて免疫染色を行ったところ、細胞外基質に染色を呈し、当該細胞外基質が軟骨に特異的な基質であることが示された（図 3）。

実施例 2 軟骨細胞の移植

先ず継代培養または重層培養のフラスコから培地を除去した後、細胞をセル・リフターで集め、この集まった細胞を注射等に吸引して採取した。この採取した注射筒にある軟骨細胞をヌードマウスの軟骨欠損部位に注射針を用いて注入した。この移植 6 月後に移植部位から一部採取して組織学的に検討し生着したことを確認した。即ち、採取した組織をヘマトキシリンーエオジン（H. E）染色したところ、細胞が重層化して細胞同士が基質を介して結合しているが示された（図 4）。また、軟骨組織の分子マーカーである II 型コラーゲンについて免疫染色を行ったところ、細胞外基質に染色を呈し、当該細胞外基質が軟骨に特異的な基質であることが示された（図 5）。さらに、トルイジン・ブルー染色でメタクロマジーが示され、軟骨のマーカーであるアグリカンの存在を示唆された（図 6）。以上から、移植した軟骨細胞は軟骨組織を形成していたことが示された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、ヒトの軟骨細胞を、細菌・ウイルスによる感染の恐れがなく、しかも、迅速かつ大量に正常な軟骨細胞またはその細胞塊を得ることができる。

請求の範囲

1. 軟骨膜を有する軟骨から得られる軟骨細胞を軟骨膜と共に培養することを特徴とするヒト軟骨細胞の製法。
2. 該軟骨が、耳介軟骨であることを特徴とする請求項1に記載の製法。
3. 培養細胞を単層的または重層的に1回または2回以上播種して培養し、軟骨細胞塊を得ることを特徴とする請求項1の製法。
4. 培養細胞を単層的または重層的に1回または2回以上播種して培養し、軟骨細胞塊を得ることを特徴とする請求項2記載の製法。
5. 請求項1乃至4に記載の製法により得られるヒト軟骨細胞単独または該軟骨細胞と包埋材料とからなる軟骨治療材。
6. 該包埋材料が、コラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、アルギン酸、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸・ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン、グルコサミノグリカンまたはヒトの真皮の一種又は二種以上から選ばれる請求項5に記載の軟骨治療材。

Fig.1

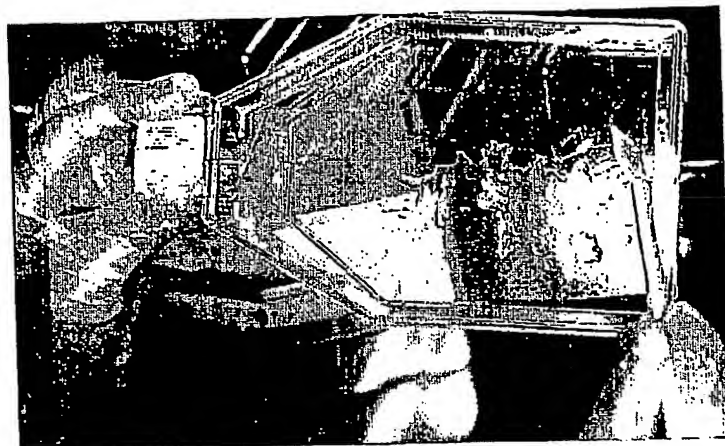


Fig.2

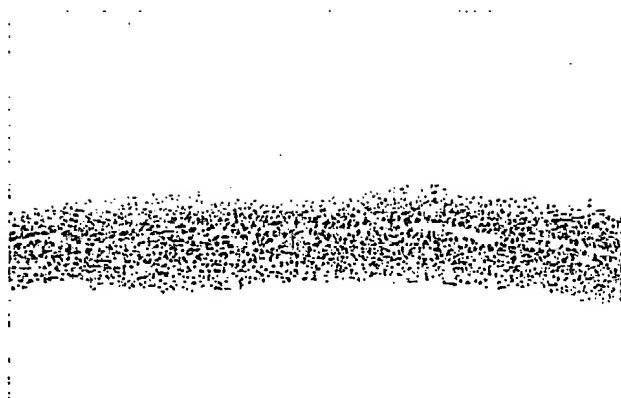


Fig.3



Fig.4

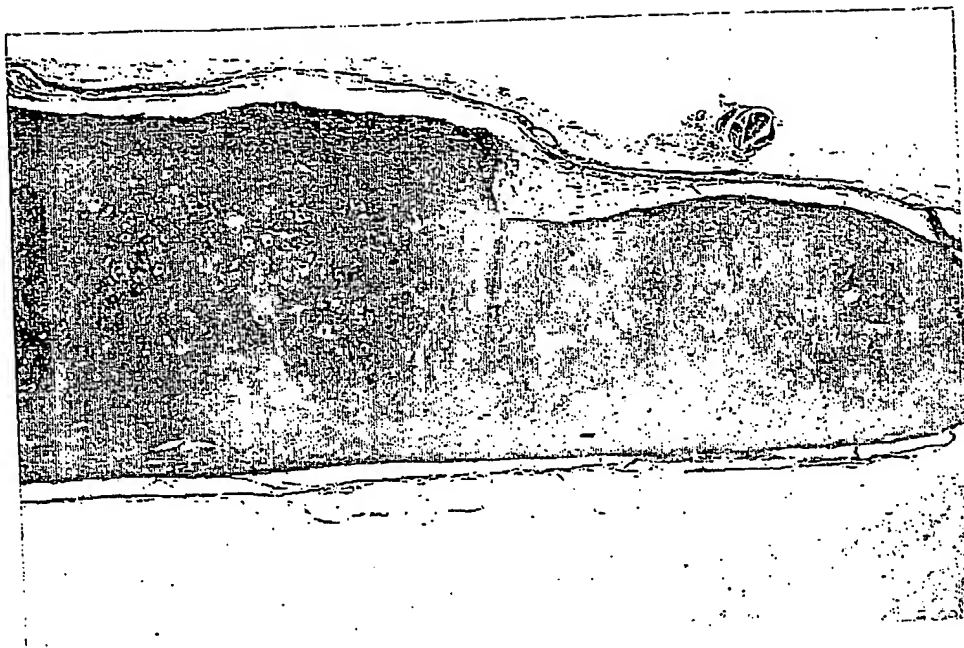


Fig.5

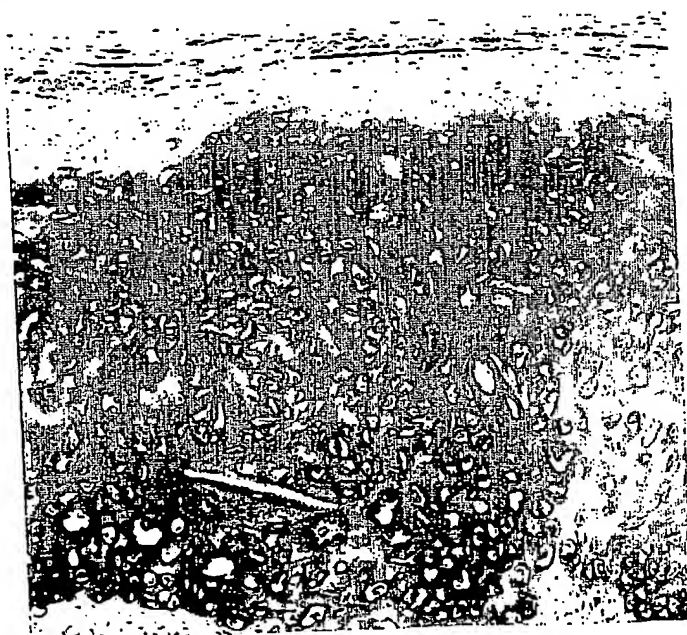


Fig.6



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N5/08, A61L27/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 C12N5/08, A61L27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/012451 A1 (矢永博子) 2002.02.14 & AU 200178700 A & EP 1331264 A1 & US 2003/0180943 A1	1-6
X	安達伸生他, 組織工学に基づく培養軟骨細胞移植, 医学のあゆみ, 2002, Vol. 200, No. 3, pp. 258-259	1-6
X	Brittberg M. et al., Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, N Engl J Med, 1994, Vol. 331, No. 14, pp. 889-895	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.05.2004

国際調査報告の発送日

25.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

七條 里美

4 B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	松田和也他, 人工軟骨作成の試み, 医学のあゆみ, 1995, Vol. 172, No. 6, pp. 390-391	1-6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.